

学校编码: 85303, 10384

分类号_____密级_____

学 号:

UDC_____

博士后研究报告

漳江口红树林沉积物微生物多样性研究及宏基因组
文库中次级代谢产物生物合成相关基因（簇）的筛选

**Microbial diversity investigation of the mangrove sediments from
Zhangjiang estuary and the screening of genes (clusters) associated
with secondary metabolite production from metagenomic library**

张熙颖

合作导师姓名: 徐 洵 教授 (海洋三所)

李少菁 教授 (厦门大学)

徐 俊 副研究员 (海洋三所)

工作执行时间: 2005 年 1 月- 2006 年 12 月

国家海洋局第三海洋研究所博士后科研工作站

厦门大学海洋科学博士后流动站

2006 年 12 月

国家海洋局第三海洋研究所

厦门大学

博士后研究工作报告原创性声明

本人郑重声明：所呈交的博士后研究工作报告，是本人在合作导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除报告中已经注明引用的内容外，本报告不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本报告的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在报告中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

博士后研究工作报告作者签名：

日期： 年 月 日

国家海洋局第三海洋研究所

厦门大学

博士后研究工作报告版权使用授权书

本报告作者完全了解厦门大学及国家海洋局第三海洋研究所有关保留、使用博士后研究工作报告的规定，同意厦门大学及国家海洋局第三海洋研究所保留并向国家有关部门或机构送交博士后研究工作报告的复印件和电子版，允许博士后研究工作报告被查阅和借阅。本人授权厦门大学及国家海洋局第三海洋研究所可以将博士后研究工作报告的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本博士后研究工作报告。

本博士后研究工作报告属于：

保密 ☐，在 年解密后适用本授权报告。

不保密 ☒。

（请在以上方框内打“√”）

博士后研究工作报告作者签名：

合作老师签名：

日期： 年 月 日

日期： 年 月

目 录

| | |
|---|----|
| 摘 要..... | 1 |
| ABSTRACT..... | 3 |
| 第一章 前 言..... | 5 |
| 1 分子生物学技术在微生物多样性研究中的应用..... | 5 |
| 2 宏基因组技术在发现新型次级代谢产物研究中的应用..... | 6 |
| 3 本报告的研究思路、目的和意义..... | 10 |
| 参考文献..... | 10 |
| 第二章 红树林沉积物微生物多样性研究..... | 14 |
| 1 材料与方法..... | 15 |
| 1.1 材料..... | 15 |
| 1.1.1 红树林沉积物样品采集及处理..... | 15 |
| 1.1.2 菌株与质粒..... | 16 |
| 1.1.3 主要试剂..... | 16 |
| 1.1.4 主要仪器..... | 16 |
| 1.1.5 培养基..... | 17 |
| 1.1.6 溶液..... | 17 |
| 1.2 方法..... | 19 |
| 1.2.1 红树林沉积物样品中总 DNA 的提取..... | 19 |
| 1.2.2 红树林沉积物总 DNA 中细菌古菌 16SrDNA 基因目的片段的 PCR 扩增..... | 20 |
| 1.2.3 琼脂糖凝胶中扩增 DNA 片段的回收..... | 20 |
| 1.2.4 扩增 DNA 片段与 T 载体 (pMD18-T) 的连接..... | 21 |
| 1.2.5 <i>E. coli</i> DH5 α 化学感受态细胞的制备..... | 21 |
| 1.2.6 红树林沉积物中细菌及古菌 16SrDNA 基因克隆文库的构建..... | 21 |
| 1.2.7 文库中克隆的 Amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) 分型..... | 22 |
| 1.2.8 序列及系统发育分析..... | 22 |

| | |
|--|----|
| 1.2.9 核酸序列号..... | 22 |
| 2 结果与分析..... | 22 |
| 2.1 红树林沉积物总 DNA 的提取..... | 22 |
| 2.2 细菌及古菌 16SrDNA 片段的扩增..... | 23 |
| 2.3 细菌及古菌 16SrDNA 基因文库的构建及 ARDRA 分析..... | 24 |
| 2.4 红树林沉积物中细菌多样性分析..... | 25 |
| 2.5 红树林沉积物中古菌多样性分析..... | 31 |
| 3 讨论..... | 37 |
| 参考文献..... | 40 |
| 第三章 红树林沉积物放线菌菌群多样性研究..... | 46 |
| 1 材料与方法..... | 47 |
| 1.1 材料..... | 47 |
| 1.2 方法..... | 47 |
| 1.2.1 红树林沉积物样品总 DNA 的提取..... | 47 |
| 1.2.2 红树林沉积物样品总 DNA 放线菌 16SrDNA 目的片段的 PCR 扩增..... | 48 |
| 1.2.3 放线菌 16SrDNA 基因文库的构建及 ARDRA 分型..... | 48 |
| 1.2.4 序列及系统发育分析..... | 48 |
| 1.2.5 放线菌菌株的分离纯化和鉴定..... | 48 |
| 1.2.6 分离放线菌菌株的 PKS 及 NRPS 相关基因片段扩增..... | 49 |
| 1.2.7 分离放线菌菌株的抗菌活性测定..... | 49 |
| 1.2.8 核酸序列 GenBank 登录号(accession number)..... | 50 |
| 2 结果与分析..... | 50 |
| 2.1 放线菌 16SrDNA 片段的扩增..... | 50 |
| 2.2 放线菌 16SrDNA 基因文库构建及 ARDRA 分型..... | 50 |
| 2.3 红树林沉积物放线菌 16SrDNA 基因文库中放线菌类群多样性分析 | 51 |
| 2.4 红树林沉积物放线菌分离菌株的种群多样性..... | 55 |
| 3 讨论..... | 60 |

| | |
|---|----|
| 参考文献..... | 62 |
| 第四章 红树林沉积物微生物宏基因组 Cosmid 文库的构建及宏基因组文库中次级代谢产物生物合成相关基因（簇）的筛选..... | 65 |
| 1 材料与方法..... | 66 |
| 1.1 材料..... | 66 |
| 1.1.1 菌株..... | 66 |
| 1.1.2 试剂盒..... | 67 |
| 1.1.3 溶液..... | 67 |
| 1.2 方法..... | 67 |
| 1.2.1 红树林沉积物样品 cosmid 宏基因组文库的构建..... | 67 |
| 1.2.2 宏基因组文库中含次级代谢产物生物合成相关基因的阳性克隆的筛选定位..... | 70 |
| 2 结果与分析..... | 72 |
| 2.1 红树林沉积物样品 cosmid 宏基因组文库的构建和评估..... | 72 |
| 2.2 宏基因组文库中次级代谢产物生物合成相关基因的筛选..... | 72 |
| 3 讨论..... | 78 |
| 参考文献..... | 81 |
| 总结与展望..... | 84 |
| 致 谢..... | 86 |
| 博士后期间待发表文章及参与研究的课题项目..... | 87 |
| 附 录..... | 88 |
| 简 历..... | 89 |

CONTENTS

| | |
|--|----|
| Chinese abstract | 1 |
| English abstract..... | 3 |
| Chapter 1 Forewords..... | 5 |
| 1 The application of molecular biotechniques in researches on microbial diversity | 5 |
| 2 The application of metagenome technique in researches on novel secondary metabolites | 6 |
| 3 Purpose and significance of this report..... | 10 |
| Reference | 10 |
| Chapter 2 Microbial diversity investigation of mangrove sediments | 14 |
| 1 Materials and methods | 15 |
| 1.1 Materials | 15 |
| 1.1.1 Samples collection | 15 |
| 1.1.2 Strains and plasmids | 16 |
| 1.1.3 Reagents | 16 |
| 1.1.4 Apparatus | 16 |
| 1.1.5 Medium | 17 |
| 1.1.6 Solutions | 17 |
| 1.2 Methods..... | 19 |
| 1.2.1 DNA extraction of mangrove sediments..... | 19 |
| 1.2.2 PCR amplification of the bacterial or archaeal 16S rDNA gene fragment | 20 |
| 1.2.3 Recovery of amplified fragment from agarose gel | 20 |
| 1.2.4 Ligation of the purified fragment and the T vector | 21 |
| 1.2.5 Preparation of competent cells of <i>E. coli</i> DH5 α | 21 |
| 1.2.6 Bacterial and archaeal 16S rDNA clones library construction | 21 |
| 1.2.7 The amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) of the 16S rDNA clones..... | 22 |

| | |
|--|----|
| 1.2.8 Phylogenetical analysis | 22 |
| 1.2.9 Genbank accession numbers | 22 |
| 2 Results and analyses | 22 |
| 2.1 Total DNA extraction of mangrove sediments..... | 22 |
| 2.2 PCR amplification of the bacterial or archaeal 16S rDNA gene fragment | 23 |
| 2.3 Construction of bacterial and archaeal 16S rDNA library and the ARDRA analyses | 24 |
| 2.4 Analysis of the bacterial diversity in mangrove sediments | 25 |
| 2.5 Analysis of the archaeal diversity in mangrove sediments..... | 31 |
| 3 Discussion..... | 37 |
| Reference | 40 |
| Chapter 3 Study on the actinobacterial diversity in mangrove sediments | 46 |
| 1 Materials and methods | 47 |
| 1.1 Materials | 47 |
| 1.2 Methods..... | 47 |
| 1.2.1 Total DNA extraction of mangrove sediments..... | 47 |
| 1.2.2 Amplification of the actinobacterial 16SrDNA gene fragment..... | 48 |
| 1.2.3 Construction of actinobacterial 16S rDNA clones library and the the ARDRA analyses..... | 48 |
| 1.2.4 Phylogenetical analysis | 48 |
| 1.2.5 Isolation and identification of actinomycetes from mangrove sediments..... | 48 |
| 1.2.6 PCR amplification of the PKS and the NRPS gene fragments..... | 49 |
| 1.2.7 Detection of the antimicrobial activities of the isolated strains | 49 |
| 1.2.8 Genbank accession numbers | 50 |
| 2 Results and analyses | 50 |
| 2.1 PCR amplification of the actinobacterial 16SrDNA gene fragment..... | 50 |
| 2.2 Construction of actinobacteria 16S rDNA library and the ARDRA analyses | 50 |

| | |
|--|----|
| 2.3 The actinobacterial diversity in the actinobacteria 16S rDNA library ... | 51 |
| 2.4 Population diversity of the isolated actinomycetes strains | 55 |
| 3 Discussion | 60 |
| Reference | 62 |
| Chaper 4. Construction of metagenomic cosmid library of mangrove sediments and the screening of the genes(clusters) associated with secondary metabolite production from the library | 65 |
| 1 Materials and Methods | 66 |
| 1.1 Materials | 66 |
| 1.1.1 Strains..... | 66 |
| 1.1.2 Kit | 67 |
| 1.1.3 Solutions | 67 |
| 1.2 Methods..... | 67 |
| 1.2.1 Construction of metagenomic cosmid library of mangrove sediments..... | 67 |
| 1.2.2 Screening of the positive clone containing genes associated with secondary metabolite production | 70 |
| 2 Results and analyses | 72 |
| 2.1 Construction and evaluation of metagenomic cosmid library of mangrove sediments..... | 72 |
| 2.2 The screening of genes associated with the secondary metabolite production from the metagenomic library | 72 |
| 3 Discussion | 78 |
| Reference | 81 |
| Conclusion and prospect | 84 |
| Acknowledgements..... | 86 |
| Papers accepted or submitted and the projects participated in | 87 |
| Appendix..... | 88 |
| Resume..... | 89 |

摘 要

红树林是热带或亚热带海岸潮间带所特有的木本植物群落, 具有非常重要的经济和生态学价值。红树林生态系统是世界上生产力最高的生态系统之一, 微生物是其中重要的生物组成成份。微生物在推动红树林生态系统中的能量流动, 促进红树林生态系统中各营养元素转化和再循环方面起着关键的作用。本报告主要通过红树林沉积物中环境总DNA的16SrDNA文库及宏基因组文库构建及分析的研究, 以调查中国福建漳江口红树林湿地自然保护区沉积物中的微生物多样性, 并挖掘红树林沉积物中新型的菌株及基因资源。

本报告的主要的研究内容和结果包括:

1) 提取红树林沉积物总 DNA, 利用细菌和古菌特异性 16SrDNA 引物, 通过 PCR 扩增等方法, 分别构建了红树林沉积物样品中细菌和古菌的 16S rDNA 文库, 对这两个文库的分析结果显示: 变形细菌群 (58.3%) 是红树林沉积物细菌类群中的优势菌群, 除此之外, 在红树林沉积物中也存在绿曲挠菌群, 浮霉状菌群, 酸杆菌群, 革兰氏阳性细菌群, 噬纤维菌-屈挠杆菌-拟杆菌群和疣微菌门等细菌类群。在古菌类群中, 泉古菌的成员占较大优势(66.2 %), 而其中的 MCG (*Miscellaneous crenarchaeotal group*) 类群是红树林沉积物中第一大古菌类群 (53.7 %)。红树林沉积物中的广古菌成员大部分属于 *Marine benthic group D* (MBG-D) 类群。

2) 构建了红树林沉积物样品中放线菌的 16S rDNA 文库。对该库的分析结果表明酸微菌亚纲 (48.8 %) 和微球菌亚目 (30.8 %) 放线菌是红树林沉积物样品中放线菌类群的优势菌群。另外, 通过这种方法也在红树林沉积物中检测到了链霉菌属, 分枝杆菌属, 地嗜皮菌属和糖丝菌属等属放线菌的存在。通过平板分离方法在红树林沉积物中分离得到 92 株分别属于链霉菌属, 小单孢菌属, 马杜拉菌属, 拟诺卡氏菌属, 糖单孢菌属等属的放线菌菌株。其中链霉菌属 (76.1%) 和小单孢菌属 (15.1%) 放线菌是分离菌株中的优势菌属。分离菌株中有 5 株可能为新种, 而约有 50% 的分离菌株有抗菌活性。

3) 构建了约有 2100 个克隆的红树林沉积物微生物宏基因组文库, 每个克隆的外源插入片段平均长度为 30Kb。该库至少包含了约 66Mb 红树林沉积物样品环

境 DNA。利用多对兼并引物，以 PCR 的方式，对该库中可能存在的携带有次级代谢产物生物合成相关基因（簇）的克隆进行了筛选，并从中筛选出一个含有非核糖体多肽合成酶（NRPS）相关基因的克隆 4F11。4F11Cosmid 质粒中的外源插入片段长度约有 34Kb，其中有约长 19Kb 的片段与非核糖体多肽合成酶基因簇有关。序列分析表明该非核糖体多肽合成酶基因簇相关序列含有编码非核糖体多肽合成酶所需结构域即腺苷酰化结构域，缩合结构域，肽酰载体蛋白结构域和硫酯酶结构域等的多个基因区段，具有模块化结构，可能是一完整的新型非核糖体多肽合成酶基因簇。

关键词：红树林，微生物多样性，系统发育分析，宏基因组文库，次级代谢产物生物合成基因簇

ABSTRACT

Mangroves are unique woody plant communities growing in intertidal zones of tropical and subtropical coast. They cover 60-75 % of the world's tropical and subtropical coastlines and possess importantly economic and ecological value. The mangrove ecosystem is one of the most productive ecosystems around the world. In mangrove ecosystem, microbes are considered as the most important components responsible for transformations and recyclings of nutrients. Resource of microbes in mangrove ecosystem is abundant, study on diversity and exploitation of the microbial resource in mangrove ecosystem is of great importance. So in this report, by constructions and analyses of the 16SrDNA clone library and the metagenomic library of total DNA from mangrove sediments of Zhangjiang estuary, Fujian of China, the microbial diversity in and the novel gene prospection from mangrove ecosystem were studied.

The main contents and results of this report were as follows:

1) Total DNAs were extracted from mangrove sediments of Zhangjiang estuary, Fujian of China. The 16S rDNA fragments of bacteria and archaea were amplified by PCR from the total DNAs with bacteria- and archaea- specific primers, respectively. The PCR products were cloned to construct 16S rDNA libraries of bacteria and archaea. The bacterial or archaeal 16S rDNA clones selected by the amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) were sequenced and then phylogenetically analyzed. The results showed that: Proteobacteria (58.3%), especially γ -, ϵ -, δ - subdivision of Proteobacteria predominated in the bacterial community of mangrove sediments. Besides, other six groups in bacteria domain including Chloroflexi, Planctomycetes, Acidobacteria, Gram-positive group, Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides and Verrucomicrobia were also detected in mangrove sediments. All detected archaea in mangrove sediments belonged to four lineages in Crenarchaeota phylum and Euryarchaeota phylum, respectively. The miscellaneous crenarchaeotal group (MCG) crenarchaea (53.7 %) in Crenarchaeota phylum was the major archaeal group in mangrove sediments.

2) The actinobacterial diversity in mangrove sediments of Zhangjiang estuary, Fujian of China was investigated by culture-independent and culture-dependent methods. Analysis of the actinobacteria 16S rDNA clones libraries demonstrated members of the sub-class Acidimicrobiae(48.8 %) and the sub-order Micrococcineae (30.8 %) were predominant in the actinobacterial community in mangrove sediments. Members of other actinobacterial genera like *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Geodermatophilus*, *Saccharothrix* were also detected in mangrove sediments by phylogenetical analyses of the 16S rDNA clones in the library. 92 strains of actinomycetes were isolated from mangrove sediments by plate technique and were identified to the genus level according to the results of the 16S rDNA-sequence based alignments and phylogenetical analyses. The two genera, *Streptomyces*(76.1 %) and *Micromonospora* (15.1 %) in which there were total 5 potential new species, were the two dominant genera of the isolated strains. Total 46 isolated strains(50 %) showed antimicrobial activities.

3) A metagenomic cosmid library containing about 2100 clones was constructed with the large DNA fragments obtained from mangrove sediments. The average length of the inserted DNA fragment in every clone was above 30Kb. With several pairs of specific degenerate primers, PCR screening of the cosmid clones carrying the genes (clusters) associated with secondary metabolites production was performed. A clone named 4F11 was then selected out of the metagenomic cosmid library in this way. The length of the inserted DNA fragment in 4F11 was 34,506 bp, of which about 19Kb was closely related with the nonribosomal peptide synthetase gene cluster. Sequence analysis of the 19Kb fragment revealed there existed many gene sections coding for adenylation domain, condensation domain, peptidyl carrier protein domain and thioesterase domain, respectively in this fragment, and the gene sections of this fragment formed 7 modules involved in a nonribosomal peptide biosynthesis, which indicated it was a intact gene cluster sequence coding for a novel nonribosomal peptide synthetase.

Key words: Mangrove, Microbial diversity, Phylogenetic analysis, Metagenomic library, Gene clusters of secondary metabolites biosynthesis

第一章 前言

1 分子生物学技术在微生物多样性研究中的应用

传统的微生物多样性研究很大程度上依赖于微生物的培养和纯种分离技术,该技术具有很大的局限性,环境样品中的绝大部分微生物无法通过这种技术实现人工培养,因此由微生物的培养和纯种分离技术得到的信息不能全面反映所在环境的微生物多样性及其基因多样性。分子生物学技术在生态学中的应用改变了这一状况。利用分子生物学技术,研究者不必培养微生物,就可以直接对环境微生物的类群甚至其生理代谢特征进行分析研究,这克服了培养技术的限制,使得对微生物多样性的研究进入了一个新阶段(Pace , 1997)。在微生物多样性研究中常用的分子生物学技术现简述如下:

1) 聚合酶链式反应法(PCR)

即依靠具有类群特异性的引物,利用PCR扩增得到目的基因,根据目的基因的测序结果,来鉴别特定微生物类群存在与否(Pillai *et al*, 1991; Steffan and Atlas, 1991)。PCR 法实验操作简单快捷,灵敏度高,对样品的要求低,只要有完整的靶序列即可,失活的样品也同样适用。但PCR 也具有其显著的局限性,如在扩增中易出现“错配”现象,较易发生模板污染等。

2) 克隆基因文库分析法

即提取环境样品中微生物的混合基因组DNA并以PCR 法扩增保守序列(常见为16SrDNA序列),然后建立基因文库(Hugenholtz *et al*,1998)或者直接将环境DNA片段连接到载体中以构建环境样品的宏基因文库(Beja, 2004),最后通过分析基因文库获得关于微生物群落多样性的信息。该法是目前最常用的分析环境样品微生物多样性及其群落结构的方法。

3) 基因指纹图谱技术

通过各种手段对PCR扩增的特异目的基因进行精细区分,以鉴定其代表的微生物类群,包括单链构象多态性法(SSCP)(Lee *et al*, 1996),变性梯度凝胶电泳法(DGGE)(Murray *et al*, 1996),温度梯度凝胶电泳法(TGGE)(Felske *et al*, 1998),限制性酶切末端片段长度多态性法(T-RFLP)(Liu *et al*, 1997)等,在此并不一一详述。

4) 核酸分子杂交技术

人工合成能与某类群微生物特征基因序列互补的寡聚DNA 或RNA 探针,并以荧光或放射性标记探针,然后利用探针与微生物基因杂交,通过荧光显微镜技术或放射自显影技术对微生物的群落结构进行研究(Harmsen *et al*,1996)。包括膜杂交和原位杂交方法等。但该法只能用来检测事先为之设计好探针的类群。

2 宏基因组技术在发现新型次级代谢产物研究中的应用

分子生态学的研究证明在环境中大量存在未培养的微生物。在现有的技术条件下,能够培养的微生物,不超过环境微生物种类的1% (Amann *et al*, 1995),如何利用这些几乎是无限的却无法培养的微生物资源是人们面临的一个难题。这需要理念和技术方法的创新。1998年 Handelsman 等提出用“宏基因组 (Metagenome) ”技术突破纯培养限制以研究环境微生物资源的新观点 (Handelsman *et al*, 1998)。其基本的原理为直接从环境样品中提取总DNA,经纯化把这些DNA片段连接到载体上,并将其导入替代宿主细胞,形成重组DNA文库即宏基因组文库,对宏基因组文库克隆进行各种目的的筛选或随机测序,即可获得环境微生物中大量的可用基因资源。其实质是利用文库的形式,对环境微生物中的基因资源进行整理和挖掘。宏基因组文库既包含了可培养的又包含了未培养的微生物基因,可避开微生物分离培养的限制,因而扩展了环境微生物资源的研究利用空间。该技术一经提出,即迅速得到响应和普及。目前已利用多种环境样品如土壤、海水、海洋浮游生物、海绵、甲虫、人唾液等等成功构建了各式各样的宏基因组文库。人们构建这些宏基因组有两个目的: 1) 对其进行“生物探矿”,从中筛选各种新型生物活性物质主要包括各种酶类及一些次级代谢产物,如脂酶/酯酶、蛋白酶、淀粉酶、抗菌抗肿瘤活性物质等和一些有用基因片段如抗生素抗性基因及次级代谢产物合成相关基因如新型PKS和NRPS基因簇片段等 (Henne *et al*, 1999; Henne *et al*, 2000; Brady *et al*, 2001; Lorenz *et al*, 2002; Courtois *et al*, 2003; Diaz-Torres *et al*, 2003; Knietsch *et al*, 2003; Ginolhac *et al*, 2004; Handelsman, 2004; Riesenfeld *et al*, 2004; Lorenz and Eck, 2005; Schirmer *et al*, 2005)。2) 通过对文库中未培养微生物的基因片段的分析,获得某些未培养微生物的部分生理特征,生态分布等等信息 (Stein *et al*,1996; Beja *et al*, 2000; Beja, 2004; Suzuki *et al*, 2004; Schleper *et al*, 2005)。

这其中利用宏基因组技术发现新型次级代谢产物及其相关合成基因（簇）的研究尤其令人瞩目。在次级代谢产物的研究方面，目前困扰人们的是次级代谢产物的重复发现问题，即由于利用分离培养的方法获得新型菌株的能力有限，人们常常在所谓“新菌株”（其实为相似菌株）的发酵液中发现以前早已发现过的次级代谢产物（或化合物）。而宏基因组技术由于能够利用环境中数量巨大且几乎具有无限多样的次级代谢产物产生能力的未培养微生物资源，从而有望部分解决上述问题。这一观点也可以由下文所描述的这方面已取得的一些进展所证实。

由于次级代谢产物生物合成基因经常以基因簇的形式存在，因而目前在利用宏基因文库获得新型次级代谢产物的研究中，在构建文库时多采用细菌人工染色体(BAC)和粘粒（Cosmid）等大片段插入载体。而对文库克隆的筛选上多采用功能驱动筛选（function-driven screening）策略（Handelsman, 2005），即根据重组克隆产生的活性进行筛选。由于克隆的抗菌活性易于检测，因而在宏基因组文库构建后，往往以抗菌活性类物质为首选的筛选目标。Brady等人构建了一个含有约700,000个克隆的粘粒文库, 利用极简易的平板抑菌实验检测克隆的抗菌活性（见图1-1), 从中筛选出具有抗芽孢杆菌活性的克隆65个，并进一步从克隆的发

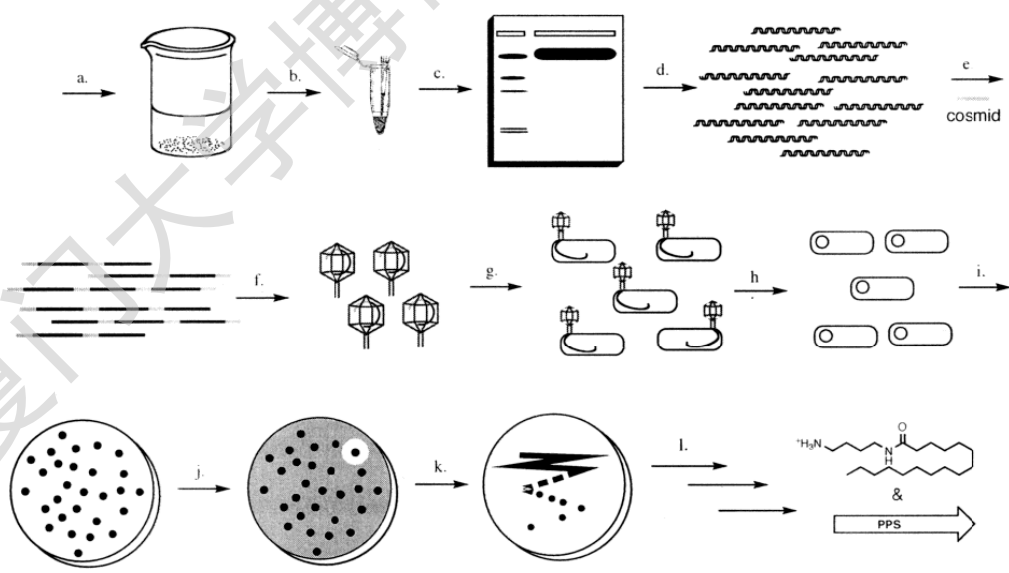


图 1-1 环境样品宏基因组文库构建及抗菌活性克隆筛选过程示意图

（a-d 环境样品总DNA 的提取及分级，e-f 环境样品总大片段DNAs与载体的连接及连接产物的包装，g-h 转染宿主，i 涂布平板待长出单菌落，j 在平板上层倾注含指示菌*B. subtilis* 的培养基，k 可产抑菌圈克隆的分离纯化，i 活性化合物的提取及结构鉴定）

Tab.1-1 Overview of the process used to construct and screen eDNA libraries for antibacterial active clones.

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库